

(19)



Eur päisches Patentamt

European Patent Office

Office ur pé n des brevets



(11)

EP 0 905 229 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:

31.03.1999 Patentblatt 1999/13

(51) Int. Cl.⁶: C12M 1/34

(21) Anmeldenummer: 98116298.5

(22) Anmeldetag: 28.08.1998

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE

Benannte Erstreckungsstaaten:

AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.09.1997 DE 19738078

(71) Anmelder:

Büchs, Jochen, Prof. Dr.-Ing.
52074 Aachen (DE)

(72) Erfinder:

- Büchs, Jochen, Prof. Dr.-Ing.
52074 Aachen (DE)
- Anderlei, Tibor
52064 Aachen (DE)

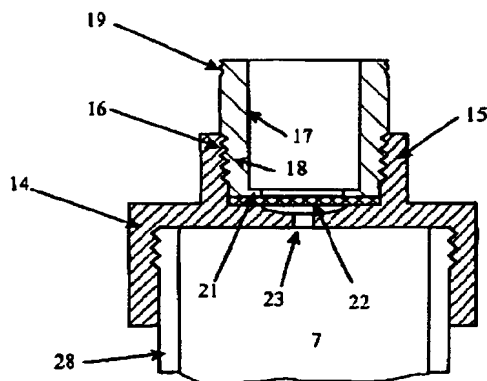
(74) Vertreter:

Kohlmann, Kai, Dipl.-Ing.
Wallstrasse 46
52064 Aachen (DE)

(54) Verfahren und Vorrichtung zur Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen in einem geschüttelten Meßkolben unter sterilen Bedingungen, wobei der Meßkolben in einer Spülphase zur Versorgung der mikrobiellen Kulturen mit Gas durchströmt wird, anschließend in einer Meßphase der Gasstrom in den Gasraum des Meßkolbens mit mindestens einem Absperrmittel unterbrochen und mit mindestens einem Meßwertgeber mindestens eine für die Atmungsaktivität der Kultur aussagekräftige Meßgröße erfaßt wird, die nach Umsetzung in ein elektrisches Signal in einem Steuerrechner verarbeitet wird. Außerdem betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

Erfindungsgemäß wird vorgeschlagen, daß jede Meßgröße durch eine sterile Trennung zwischen dem Gasraum des Meßkolbens und dem Meßwertgeber hindurch erfaßt wird.



A

Figur 2

EP 0 905 229 A2

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen durch quasikontinuierliche Messung der Atmungsaktivitäten in einem geschüttelten Meßkolben unter sterilen Bedingungen, wobei der Meßkolben in einer Spülphase zur Versorgung der mikrobiellen Kulturen mit Gas durchströmt wird, anschließend in einer Meßphase der Gasstrom in den Gasraum des Meßkolbens mit mindestens einem Absperrmittel unterbrochen und mit mindestens einem Meßwertgeber mindestens eine für die Atmungsaktivität aussagekräftige Meßgröße erfaßt wird, die nach Umsetzung in ein elektrisches Signal in einem Steuerrechner verarbeitet wird. Außerdem betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

[0002] Aus der DE 44 15 444 A1 ist ein derartiges Verfahren sowie eine Vorrichtung zu dessen Durchführung bekannt. Der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes in dem Gasraum des über ansteuerbare Ventile geschlossenen Meßkolbens wird mittels einer sterilisierbaren pO_2 -Elektrode gemessen und in dem Steuerrechner in die Sauerstofftransferrate (OTR) umgerechnet. Weitere für die Atmungsaktivität der Kultur aussagekräftige Meßgrößen lassen sich mit dem bekannten Verfahren und der Vorrichtung nicht ermitteln. Daher lassen sich einige, für die Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes der mikrobiellen Kultur wichtige Fragen, wie beispielsweise das Vorliegen einer Sauerstofflimitierung bzw. die Art der verstoffwechselten Kohlenstoffquelle, nicht beantworten.

[0003] Nachteilig bei dem bekannten Verfahren und der Vorrichtung zu dessen Durchführung ist, daß ein Ausfall der pO_2 -Elektrode zum vollständigen Abbruch des Versuchs zwingt, da sie nicht gewechselt werden kann, ohne die Kultur zu kontaminieren.

[0004] Außerdem ist die Genauigkeit der Messung vielfach nicht ausreichend, da zur exakten Berechnung der Sauerstofftransferrate (OTR) der Respirationsquotient (RQ) möglichst während der gesamten Messung bekannt sein sollte.

[0005] Ausgehend von diesem Stand der Technik liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zu dessen Durchführung vorzuschlagen, die die vorgenannten Nachteile nicht aufweist.

[0006] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Merkmale des Anspruchs 1 und 8 gelöst. Die erfindungsgemäße Maßnahme erhöht auf verblüffend einfache Art und Weise wirkungsvoll die Meßgenauigkeit des Verfahrens und der Vorrichtung. Dies ist besonders bei schwach atmenden mikrobiellen Kulturen wichtig.

[0007] Das Verfahren erlaubt erstmals den Einsatz nicht sterilisierbarer Meßwertgeber (Sterilisierungsbedingungen: $T=121^\circ C$, $p(\text{absolut})=2\text{bar}$), so daß nun auch kompaktere und damit leichtere Meßsonden verwendet werden können, die zudem wesentlich genauer arbeiten und eine bessere Auflösung aufweisen.

[0008] Ein weiterer Vorteil besteht darin, defekte Meßwertgeber während eines Versuchs auswechseln zu können, ohne die im Meßkolben befindliche mikrobielle Kultur zu kontaminieren.

[0009] Schließlich ist es aufgrund der steriltechnischen Trennung nicht mehr erforderlich, die Meßwertgeber während des Sterilisierens des Meßkolbens zwischen zwei Versuchen von ihrer Energieversorgung zu trennen. Infolgedessen entfällt die bei dem bisherigen Verfahren und der zugehörigen Vorrichtung notwendige Polarisationszeit der Meßwertgeber, so daß die Messung sofort nach Abschluß der Sterilisation gestartet werden können.

[0010] In einer Ausgestaltung der Erfindung nach Anspruch 2 wird neben der mit dem bekannten Verfahren bereits ermittelten Sauerstofftransferrate (OTR) nun auch gleichzeitig eine weitere für die Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen wichtige Meßgröße, die Kohlendioxidtransferrate (CTR), erfaßt. Hierzu wird ein Kohlendioxidmeßwertgeber eingesetzt, der vorzugsweise nach dem Infrarotprinzip arbeitet.

[0011] Durch die erfindungsgemäße Maßnahme, den Gasraum steriltechnisch von dem Meßwertgeber zu trennen, ist alternativ der Gebrauch von hochpräzisen, jedoch nicht sterilisierbaren Miniaturdrucksensoren möglich. Mit dem Drucksensor bestimmt man den Gesamtdruck im Gasraum des Meßkolbens. Während der Meßphase kann sich der Gesamtdruck ändern, wenn z.B. die mikrobielle Kultur mehr Sauerstoff einatmet als Kohlendioxid ausatmet. Mit dem parallel gemessenen Sauerstoffkonzentrationsabfall oder Sauerstoffpartialdruckabfall als Meßgröße für die Sauerstofftransferrate (OTR) wird die Kohlendioxidkonzentrationsänderung, und damit die Kohlendioxidtransferrate (CTR) vom Steuerrechner ermittelt.

[0012] Die gleichzeitige Ermittlung der Kohlendioxidtransferrate (CTR) ermöglicht es, daß im Steuerrechner aus der gemessenen Sauerstofftransferrate sowie der Kohlendioxidtransferrate der Respirationsquotient der mikrobiellen Kultur errechnet wird. Aufwendige Fermentationen in gerührten Bioreaktoren (Fermentervolumen $>1\text{L}$, mit Abgasanalytik), die bisher für die Bestimmung des Respirationsquotienten (RQ) nötig waren, sind nun nicht mehr notwendig. Da geschüttelte Meßkolben einfacher zu handhaben sind (schnell sterilisierbar, kleine Füllmenge, kleines Gewicht in großer Zahl parallel betreibbar) als gerührte Fermenter, lassen sich bei der RQ-Bestimmung mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Zeit und Kosten einsparen. Weiterhin liefert die laufende Berechnung des Respirationsquotienten (RQ) fortlaufend Informationen, beispielsweise über die Art der Nährstoffquelle, die von den mikrobiellen Kulturen assimiliert wird bzw. über die gerade dominierende Stoffwechselreaktion.

[0013] Mit dem kontinuierlich errechneten Respirationsquotienten (RQ) kann außerdem die Zusammensetzung des Spülgases besser als bei dem bekannten Verfahren der Zusammensetzung in einem normalen, konventionellen Schüttelkolben angeglichen werden. Folglich lassen sich die Meßergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens korrekt auf

die Verfahren mit normalen konventionellen Schüttelkolben übertragen.

[0014] Schließlich bietet das erfindungsgemäße Verfahren in Ausgestaltung der Ansprüche 2 und 3 die Möglichkeit, nicht nur die Sauerstoff- und Kohlendioxidtransferrate zu ermitteln und den Respirationskoeffizienten zu errechnen, sondern auch eine Fermentation in geschüttelten Meßkolben nach einer dieser Größen zu regeln. Als Stellgröße kann beispielsweise die Gaszusammensetzung im Gasinnenraum fungieren.

[0015] Eine mikrobielle Kultur gerät in Sauerstofflimitierung, wenn die gelöste Sauerstoffkonzentration in der mikrobiellen Kulturlösung unter einen für diese Kultur kritischen Wert fällt. Die Sauerstofflimitierung wirkt sich wie folgt auf die mikrobielle Kultur aus:

- Die Kultur wächst langsamer, wird aber ansonsten nicht beeinflusst.
- Die Kultur schaltet teilweise auf einen anaeroben Stoffwechselweg um und bildet ungewollte Nebenprodukte (z.B. Lactat, EtOH, usw.).
- Die Kultur schaltet ihren Wertproduktstoffwechsel vollkommen ab oder um.
- Die Kultur stirbt ab.

[0016] Alle vier Fälle sind in der industriellen Fermentation nicht erwünscht. Daher ist es wichtig, eine Sauerstofflimitierung zu erkennen und zu vermeiden.

[0017] Die zur Beurteilung mikrobieller Kulturen wichtige Frage, ob eine Sauerstofflimitierung vorliegt, läßt sich mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens in Ausgestaltung des Anspruchs 4 beantworten. Hierzu wird vorzugsweise in der Meßphase der Sauerstoffpartialdruck mit einer pO₂ - Elektrode gemessen und aus dem zeitlichen Verlauf des Signals der pO₂ - Elektrode mit Hilfe des Steuerrechners eine Sauerstofflimitierung signalisiert: Bei einem linearen Abfall des Signals liegt keine Sauerstofflimitierung vor. Eine logarithmische Form der Abfallkurve deutet indes auf eine Sauerstofflimitierung hin.

[0018] Eine weitere Steigerung der Meßgenauigkeit läßt sich erzielen, wenn durch eine Betriebsweise der herkömmlichen, an sich bekannten Magnetventile gemäß den Merkmalen des Anspruchs 5 deren schädliche Wärmeentwicklung verringert wird.

[0019] Die Wärmeentwicklung läßt sich außerdem dadurch reduzieren, wenn sowohl der Einlaß als auch der Auslaß für das Spülgas als Absperrmittel herkömmliche 3/2 Wege-Magnetventile aufweisen, die während der Meß- und der Spülphase mit dem Spülgas durchströmt werden.

[0020] Um die Dichtigkeit der Meßkolben zu testen, wird in einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung vorgeschlagen, daß vor der Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes einer mikrobiellen Kultur der Meßkolben mit einem Spülgas, beispielsweise Stickstoff, gespült wird und nach dem Schließen der Absperrmittel, beispielsweise der Magnetventile, von Aus- und Einlaß mit mindestens einem der Meßwertgeber, beispielsweise einen Sauerstoffsensoren, in Verbindung mit dem Steuerrechner eine etwaige Änderung der Zusammensetzung des Spülgases signalisiert wird.

[0021] Bleibt die Zusammensetzung des Spülgases gleich, ist der Meßkolben dicht und die Messung kann gestartet werden. Ändert sich die Zusammensetzung, müssen die Dichtungen der Meßkolben überprüft werden. Mit dieser Methode läßt sich zuverlässig sicherstellen, daß keine Meßwerte aufgrund von Undichtigkeiten der Meßkolben verfälscht werden.

[0022] Eine vorteilhafte Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens ergibt sich aus den Merkmalen des Anspruchs 8.

[0023] Wenn das Trennmittel als Sterilfilter ausgebildet ist und der Meßwertgeber in eine an dem Meßkolben angeordnete Halterung einsetzbar ist, ist es möglich, den Meßkolben ohne die Meßwertgeber zu sterilisieren. Erst nach der Sterilisation werden die Meßwertgeber wieder eingesetzt und sind sofort einsatzbereit.

[0024] Eine optische Erfassung der Gaskonzentration ermöglicht eine Vorrichtung nach Anspruch 10.

[0025] Das mit dem Schütteltablar zu bewegendes Gewicht und die Kosten der Vorrichtung lassen sich reduzieren, indem der Auslaß für das Spülgas und das dem Auslaß zugeordnete Absperrmittel als Diffusionsrohr mit einer Mindestlänge von 10 mm ausgebildet ist. Außerdem reduziert sich die Störanfälligkeit der Vorrichtung durch den Fortfall eines mechanischen Absperrmittels im Auslaß.

[0026] Das Diffusionsrohr ist beim Schließen des Absperrmittels am Einlaß mit einem Gas bekannter Zusammensetzung gefüllt. Während der Messung finden Druck- und Konzentrationsausgleichsvorgänge zwischen Gasinnenraum und Umgebung statt, die im Steuerrechner berücksichtigt werden, so daß auch ohne ein Ventil im Auslaß genaue Atmungsraten bestimmt werden können. Das Diffusionsrohr kann eine Füllung, beispielsweise Watte, enthalten, die zugleich als Sterilbarriere für den Auslaß dient.

[0027] Eine weitere Steigerung der Meßgenauigkeit läßt sich erzielen, indem anstelle der herkömmlichen Magnetventile an sich bekannte Niedrig-Energie-Ventile, zum Beispiel Impuls- oder Niederwattventile, an dem Ein- und/oder Auslaß des Meßkolbens vorgesehen werden.

[0028] Der Einsatz von Impulsventilen reduziert eine unerwünschte Wärmeentwicklung an den Ventilen, da nur zum

Schalten Energie benötigt wird. Da der Schaltvorgang nur Sekundenbruchteile dauert, wird fast keine Wärmeleistung vom Impulsventil abgegeben.

[0029] Um die störanfälligen, weil einer dauernden Belastung durch die Schüttelbewegung ausgesetzten, Kabelverbindungen zu den Absperrmitteln zu vermeiden, hat es sich als vorteilhaft herausgestellt, die Energie zu deren Betätigung von der ruhenden Umgebung auf das Schütteltablar drahtlos zu übertragen. Zur drahtlosen Energieübertragung kommt beispielsweise ein System aus einer Solarzelle und einer Lichtquelle oder ein induktives Energieübertragungssystem in Frage.

[0030] Die Übertragungssicherheit der elektrischen Signale von den Meßwertgebern zu dem Steuerrechner läßt sich dadurch erhöhen, daß Verstärker der Meßwertgeber und Analog/Digital-Wandler für die analogen elektrischen Signale der Meßwertgeber auf dem Schütteltablar angeordnet sind. Diese Maßnahme bewirkt, daß nur digitale elektrische Signale das Schütteltablar verlassen, die bekanntlich wesentlich unempfindlicher als die analogen Signale sind.

[0031] Die Betriebssicherheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung läßt sich wirksam steigern, indem die Übertragung der elektrischen Signale der Meßwertgeber drahtlos ist, beispielsweise mit einem Infrarot-Sender-Empfänger-System oder einer Funkstrecke. Außerdem wird die Handhabung der Meßkolben durch eine drahtlose Signalübertragung vereinfacht, wenn die elektrischen Signale bereits vom Meßwertgeber ausgehend übertragen werden. Ein Verkabeln der Meßwertgeber entfällt, beispielsweise wenn man die Meßkolben von dem Schütteltablar nimmt, um die Kultur anzupflanzen.

[0032] Nachfolgend wird die Erfindung anhand der Figuren 1 bis 5 näher erläutert:

[0033] Fig. 1 zeigt eine prinzipielle Darstellung einer Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Vorrichtung besteht im wesentlichen aus Meßkolben 1, die auf einem Schütteltablar 2 angeordnet sind. Jeder Meßkolben 1 besitzt einen Einlaß 3 sowie einen Auslaß 4 für ein Spülgas. Sowohl der Ein- als auch der Auslaß 3, 4 sind durch ein Magnetventil 5, 6 während der Meßphase verschließbar.

[0034] Oberhalb der Kultur sind an den Meßkolben 1 ein Meßwertgeber 8 in Form einer Sauerstoffmeßsonde sowie ein Meßwertgeber 9 in Form einer Kohlendioxidmeßsonde angeordnet. Zwischen beiden Meßwertgebern 8, 9 und dem Gasraum 7 ist ein in Figur 1 nicht erkennbares, jedoch detailliert in den Figuren 2 und 3 dargestelltes Trennmittel angeordnet.

[0035] Die in Figur 1 gestrichelt dargestellten Linien deuten die Übertragungswege der elektrischen Signale der Meßwertgeber 8 bzw. 9 und einer Gasmischbatterie 11 sowie der Energie zu den Magnetventilen 5, 6 an. Die Verarbeitung der elektrischen Signale der Meßwertgeber 8, 9 sowie die Ansteuerung der Ventile 5, 6 und der Gasmischbatterie 11 erfolgt über einen Steuerrechner 12. Ferner befinden sich im Ein- und Auslaß 3, 4 Sterilfilter 13.

[0036] Die steriltechnische Trennung der Sauerstoffmeßsonde 8 wird nachfolgend anhand von Figur 2 erläutert. Außen auf einem Ansatz 28 des Meßkolbens 1 ist ein Verbindungsstück 14 aufgeschraubt. An dem Verbindungsstück 14 ist ein Stutzen 15 mit einem Innengewinde 16 angeformt, das ein zylindrisches Haltestück 17 mit jeweils an den Stirnseiten angeordneten Außengewinden 18, 19 aufnimmt. Vor dem Einschrauben des Haltestücks 17 in den Stutzen 15 wird ein handelsüblicher Sterilfilter 22 in den Stutzen 15 eingelegt. Wie insbesondere aus Figur 2 (A) ersichtlich, kommuniziert der Gasraum 7 über einen sich trichterförmig in Richtung des Sterilfilters 13 erweiternden Durchlaß 23 mit dem durch die Sauerstoffmeßsonde gasdicht abgeschlossenen Innenraum 24 des Haltestücks 17. Anschließend wird das Haltestück 17 stirnseitig mit einem Deckel 25 verschlossen.

[0037] Die Ausführungsform nach Figur 3 unterscheidet sich von der nach Figur 2 darin, daß anstelle einer elektrochemischen Sauerstoffmeßsonde (8) ein optoelektronischer Meßwertgeber für die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration Einsatz findet. Anstelle des Sterilfilters 22 ist das Trennmittel als eine Scheibe 26 ausgebildet auf deren dem Gasraum 7 zugewandten Seite eine Indikatorschicht 27 aus Fluoreszenzfarbstoff dauerhaft aufgebracht ist. Ändert sich die Sauerstoffkonzentration im Gasinnenraum 7, reagiert die Indikatorschicht 27 mit einer Änderung der durch sie ausgesandten elektromagnetischen Strahlung im optischen Bereich. Damit ändert sich das von dem optoelektronischen Meßwertgeber 8 abgegebene elektrische Signal.

[0038] Wie bereits eingangs erwähnt, kann in einer Ausführung der Erfindung, wie sie Figur 1 zeigt, eine Sauerstofflimitierung erkannt werden, ohne die Gelöst-Sauerstoffkonzentration in der Kulturlösung direkt zu messen.

[0039] Die Sauerstofftransferrate (OTR) berechnet sich wie folgt:

$$OTR = \frac{dp_{O_2}}{dt} \cdot \frac{V_g}{V_R \cdot R \cdot T} \quad \text{Formel 1}$$

dp_{O_2}/dt Differentialquotient [bar/min]
 V_g Gasvolumen des Meßkolbens [ml]

V_f	Flüssigkeitsvolumen des Meßkolbens [ml]
T	Temperatur [K]
R	Gaskonstante [bar·l/mol/K]

- 5 **[0040]** Aus der Form der Abfallkurve des Sauerstoffpartialdrucks in der Meßphase läßt sich entnehmen, ob der Sauerstofftransport von der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit der Mikroorganismen (reaktionslimitiert) abhängt oder von dem Stoffübergang (Gasphase zu Flüssigphase) (stoffübergangslimitiert). Im ersten Fall ist der Sauerstoffverbrauch unabhängig von dem treibenden Partialdruckgefälle, d.h. der Differentialquotient aus der Formel 1 kann durch einen Differenzenquotient ersetzt werden:

10

$$\frac{\Delta p_{O_2}}{\Delta t} = OTR \cdot \frac{V_f \cdot R \cdot T}{V_g} \quad \text{Formel 2}$$

15

[0041] Formel 2 zeigt, daß bei einem linearen Sauerstoffpartialdruckabfall in der Meßphase keine Sauerstofflimitierung der Kultur vorliegt, wie dies das Diagramm in Figur 4 zeigt.

- 20 **[0042]** Liegt eine Sauerstofflimitierung vor (stoffübergangslimitiert), so ist der Sauerstoffverbrauch nicht mehr unabhängig von dem treibenden Partialdruckgefälle und die Gleichung für den Partialdruckabfall in der Meßphase sieht wie folgt aus:

25

$$\frac{\ln \frac{p_{O_2}}{p_{O_1}}}{\Delta t} = k_{La} \cdot \frac{V_f \cdot R \cdot T}{V_g \cdot H_e} \quad \text{Formel 3}$$

30

k_{La}	volumetrischer Stoffdurchgangskoeffizient [1/h]
H_e	Henry'sche Konstante [bar·l/mol]
p_{O_1}	Sauerstoffpartialdruck am Anfang der Meßphase [bar]
p_{O_2}	Sauerstoffpartialdruck am Ende der Meßphase [bar]

35

[0043] Diese Abhängigkeit von dem treibenden Partialdruckgefälle führt zu einer nicht linearen Kurvenform (vgl. Figur 4).

- 40 **[0044]** Werden an dem Ein- und Auslaß der Vorrichtung handelsübliche Magnetventile (3/2-Wegeventile) 5, 6, wie aus Figur 5 erkennbar, benutzt, kann durch Koppeln der Magnetventile 5, 6 eine Kühlwirkung erzielt werden. Hierzu verbindet man den Ausgang A1 (stromlos offen) des Magnetventils 5 am Einlaß 3 mit dem Ausgang A1 des Magnetventils 6 am Auslaß 4. Hierdurch wird sichergestellt, daß während der Meßphase (die Ventile sind stromlos) die Ventile 5, 6 mit Gas durchströmt werden. Das Durchströmen der Ventile 5, 6 bewirkt, daß sie schneller abkühlen, da sie sich während der Spülphase (Ventile werden mit Strom versorgt) erwärmt haben. Durch dieses Verfahren, wird die Wärme nicht an den Gasraum 7 des Meßkolbens 1 abgegeben, sondern an das Spülgas, welches die Magnetventile 5, 6 durchströmt.

45

50

55

Bezugszeichenliste:	
Meßkolben	1
Schütteltablar	2
Einlaß Spülgas	3
Auslaß Spülgas	4
Magnetventil Einlaß	5
Magnetventil Auslaß	6

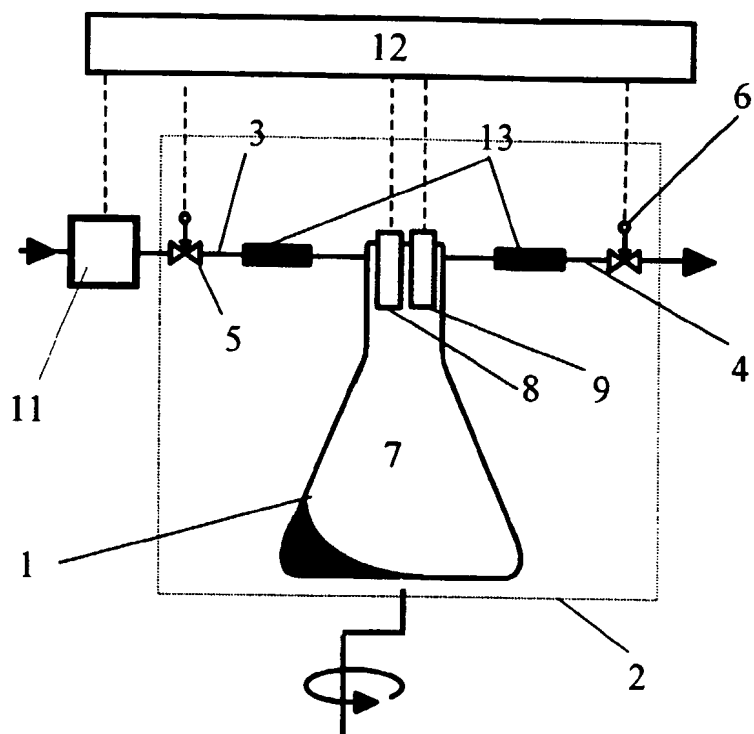
(fortgesetzt)

Bezugszeichenliste:	
Gasraum	7
Meßwertgeber (Sauerstoffmeßsonde)	8
Meßwertgeber (Kohlendioxidmeßsonde)	9
--	10
Gasmischbatterie	11
Steuerrechner	12
Sterilfilter (Einlaß / Auslaß)	13
Verbindungsstück	14
Stutzen	15
Innengewinde	16
Haltestück	17
Außengewinde	18
Außengewinde	19
--	20
Stirnfläche	21
Sterilfilter	22
Durchlaß	23
Innenraum	24
Deckel	25
Scheibe	26
Indikatorschicht	27
Ansatz am Glaskolben	28

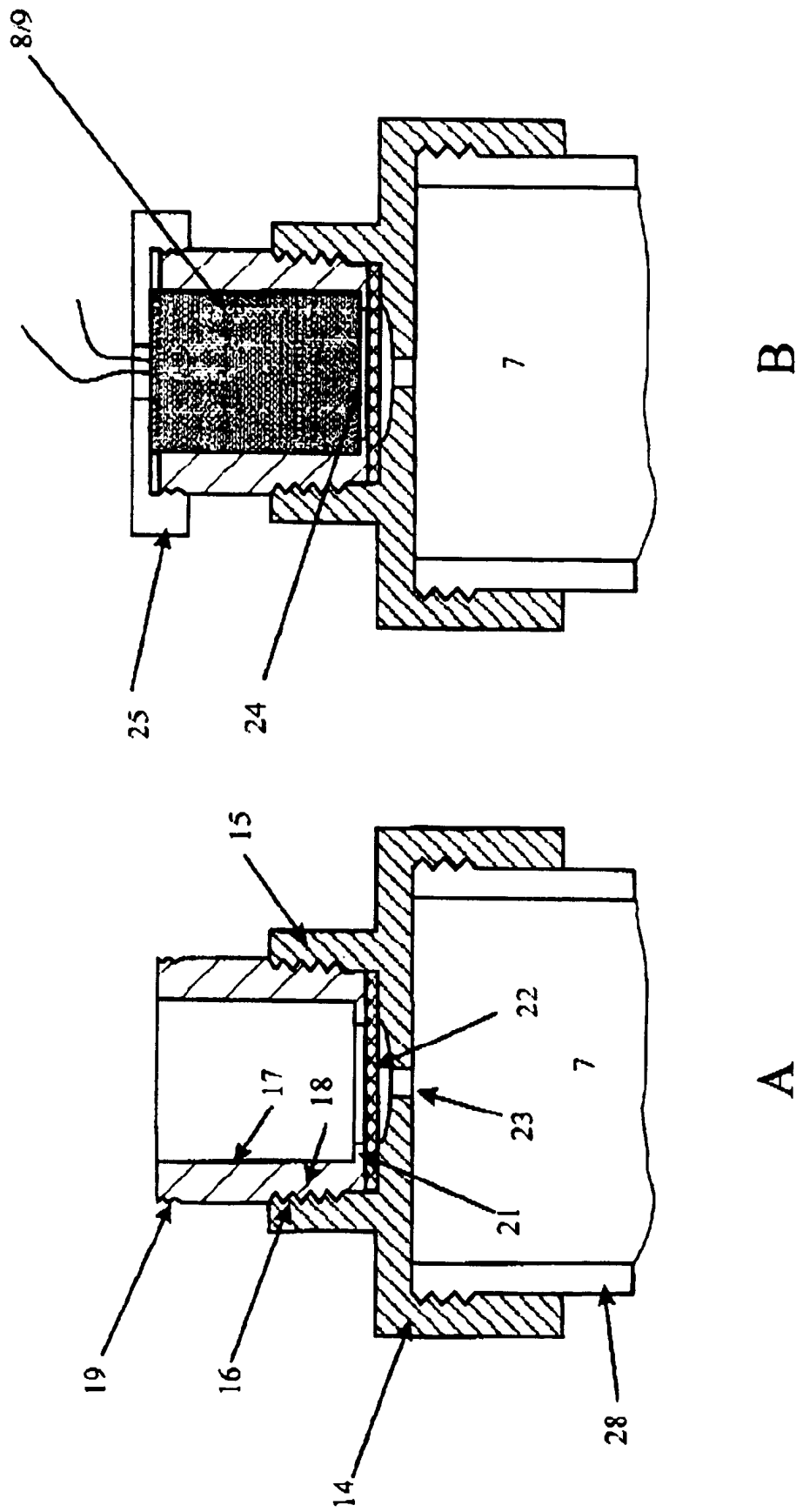
Patentansprüche

- Verfahren zur Ermittlung und Überwachung des physiologischen Zustandes mikrobieller Kulturen durch quasikontinuierliche Messung der Atmungsaktivitäten in einem geschüttelten Meßkolben (1) unter sterilen Bedingungen, wobei der Meßkolben (1) in einer Spülphase zur Versorgung der mikrobiellen Kulturen mit Gas durchströmt wird, anschließend in einer Meßphase der Gasstrom in den Gasraum (7) des Meßkolbens mit mindestens einem Absperrmittel (5, 6) unterbrochen und mit mindestens einem Meßwertgeber (8, 9) mindestens eine für die Atmungsaktivität aussagekräftige Meßgröße erfaßt wird, die nach Umsetzung in ein elektrisches Signal in einem Steuerrechner (12) verarbeitet wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß jede Meßgröße durch eine sterile Trennung (22, 26) zwischen dem Gasraum (7) des Meßkolbens (1) und dem Meßwertgeber (8, 9) hindurch erfaßt wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Meßphase mit Hilfe eines ersten Meßwertgebers (8) eine für die Sauerstofftransferrate (OTR) aussagekräftige Meßgröße und mit Hilfe eines zweiten Meßwertgebers (9) eine für die Kohlendioxidtransferrate (CTR) aussagekräftige Meßgröße erfaßt wird.
- Verfahren nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Steuerrechner (12) aus der erfaßten Sauerstofftransferrate sowie der Kohlendioxidtransferrate der Respirationsquotient (RQ) der mikrobiellen Kultur errechnet wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß in der Meßphase der Sauerstoffpartialdruck mit dem ersten Meßwertgeber erfaßt und aus dem zeitlichen Verlauf des Signals des Meßwertgebers mit Hilfe des Steuerrechners (12) eine Sauerstofflimitierung signalisiert wird.

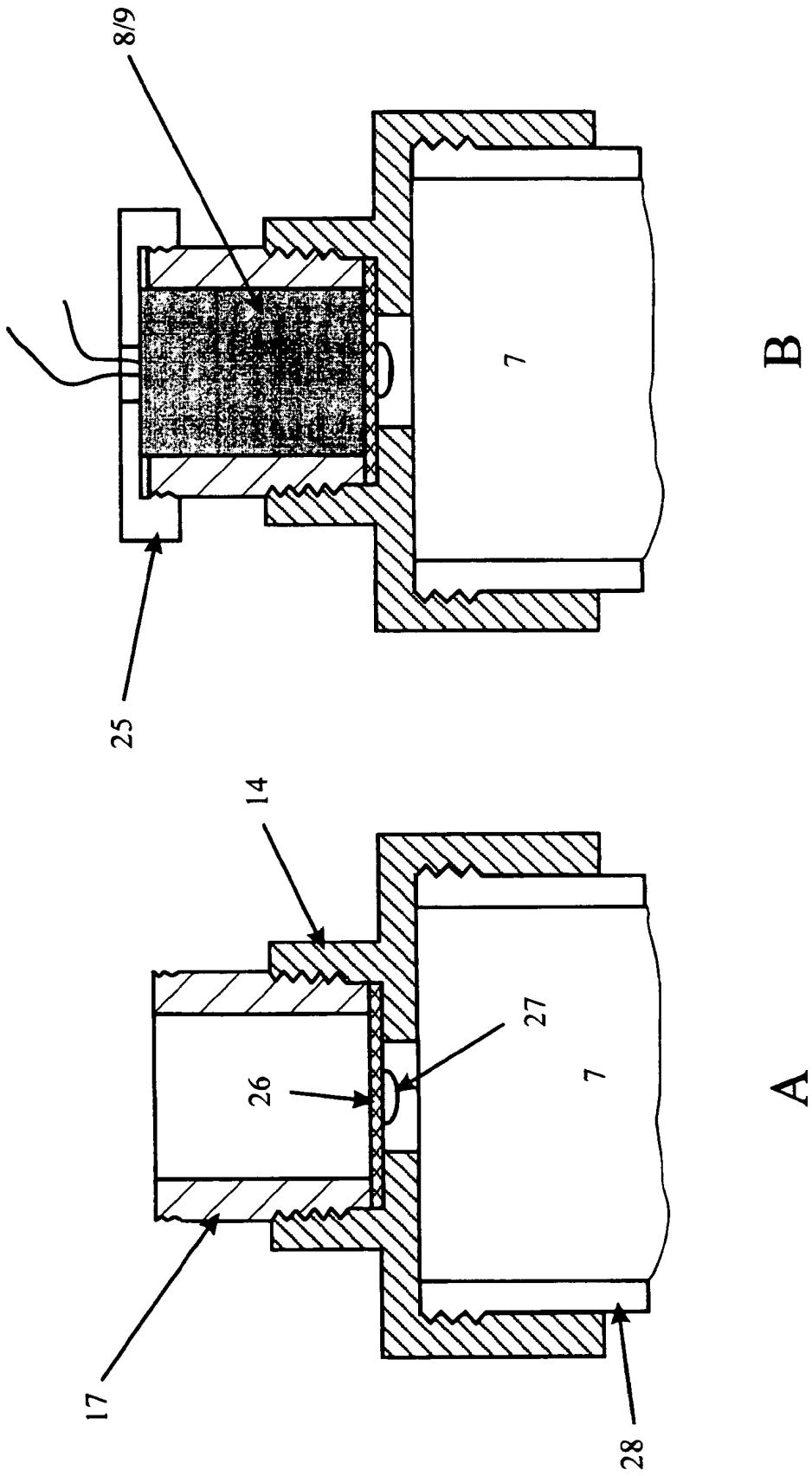
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß zumindest der Einlaß (3) für das Spülgas in den Meßkolben (1) als Absperrmittel ein Magnetventil (5) aufweist, bei dem nach dem Schaltvorgang zwischen Spül- und Meßphase die hierzu erforderliche Schaltspannung auf eine Haltespannung reduziert wird.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß sowohl der Einlaß (3) als auch der Auslaß (4) für das Spülgas als Absperrmittel 3/2 Wege-Magnetventile aufweisen, die während der Meß - und der Spülphase mit dem Spülgas durchströmt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor der Ermittlung und Überwachung
10 des physiologischen Zustandes einer mikrobiellen Kultur der Meßkolben (1) mit einem Spülgas gespült wird und nach dem Schließen der Absperrmittel (5, 6) von Aus- und Einlaß (3, 4) mit mindestens einem der Meßwertgeber (8, 9) in Verbindung mit dem Steuerrechner (7) eine etwaige Änderung der Zusammensetzung des Spülgases signalisiert wird.
- 15 8. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit mindestens einem auf einem Schütteltablar (2) angeordneten Meßkolben (1) mit einem Ein- und einem Auslaß (3, 4) für ein Spülgas, wobei zumindest dem Einlaß ein Absperrmittel (5) zugeordnet ist, mindestens einem Meßwertgeber (8, 9) zur Erfassung einer aussagekräftigen Meßgröße für die Atmungsaktivität einer mikrobiellen Kultur in dem Meßkolben (1) sowie einem Steuerrechner (12) für die Verarbeitung der elektrischen Signale jedes Meßwertgebers (8, 9), **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen jedem Meßwertgeber (8, 9) und dem Gasraum (7) des Meßkolbens (1) ein steriles Trennmittel (22, 26) angeordnet ist und jeder Meßwertgeber (8, 9) lösbar mit dem Meßkolben (1) verbunden ist.
- 20 9. Vorrichtung nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Trennmittel als Sterilfilter (22) ausgebildet ist und jeder Meßwertgeber (8, 9) in eine an dem Meßkolben (1) angeordnete Halterung (15, 17) einsetzbar ist.
- 25 10. Vorrichtung nach Anspruch 8 oder 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Trennmittel als eine Scheibe (26) aus transparentem, jedoch gasundurchlässigem Material ausgebildet ist, auf deren dem Gasinnenraum (7) zugewandten Seite eine Indikatorschicht (27) dauerhaft aufgebracht ist, die auf Änderungen der Gaskonzentration im Gasinnenraum (7) mit einer Änderung der ausgesendeten elektromagnetischen Strahlung im optischen Bereich reagiert, und der Meßwertgeber (8, 9) als optoelektronisches Bauelement ausgebildet ist.
- 30 11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Auslaß (4) für das Spülgas als Diffusionsrohr mit einer Mindestlänge von 10 mm ausgebildet ist.
- 35 12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß zumindest im Einlaß (3) für das Spülgas ein Niedrig-Energie-Ventil angeordnet ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Energieversorgung zur Betätigung der Absperrmittel (5, 6) drahtlos ist.
- 40 14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Übertragung der elektrischen Signale der Meßwertgeber (8, 9) drahtlos ist.



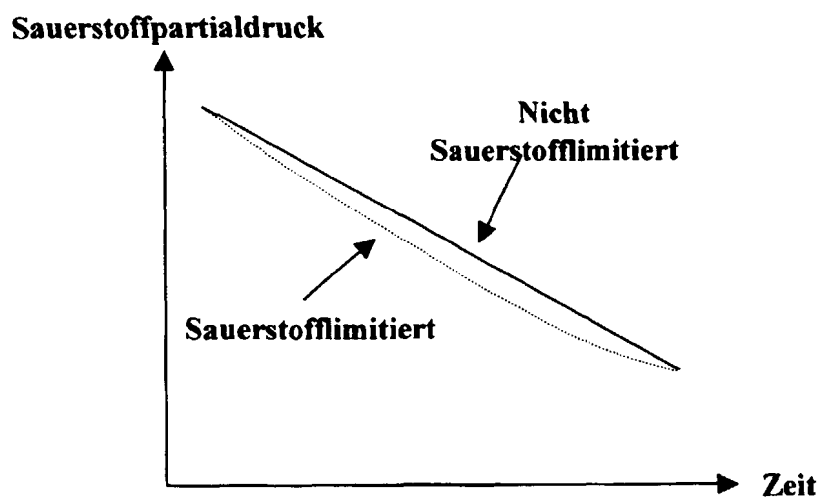
Figur 1



Figur 2

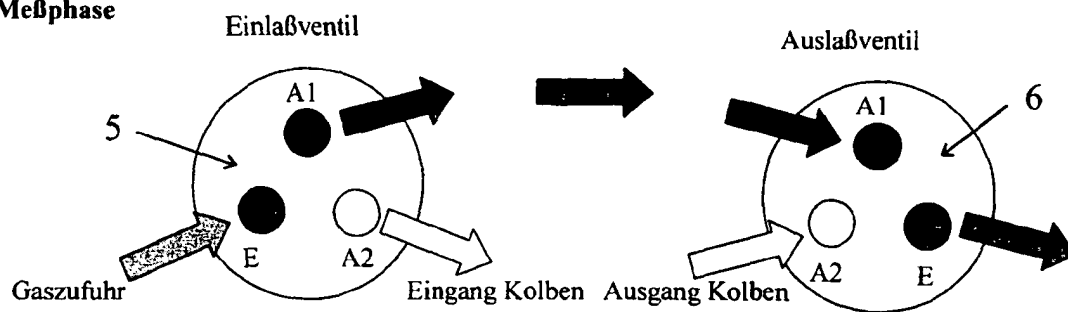


Figur 3

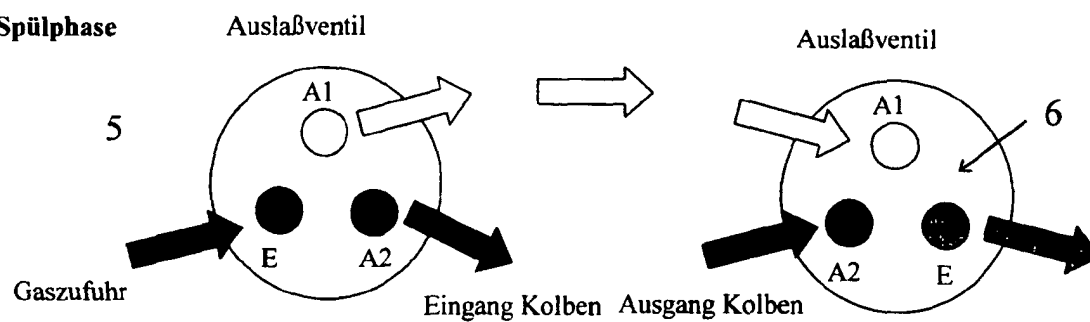


Figur 4

Meßphase



Spülphase



● Offen

○ Zu

➡ Gasstrom

➡ Kein Gasstrom

Figur 5